

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO-KULTIVIERUNG HUMANPATHOGENER
PLASMODIENARTEN UND IHRER VERWENDUNG IM INDIREKTEN
IMMUNFLUORESZENZANTIKÖRPERTEST (IFAT)

Diss
München
1907

Robert Pleier

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Universität München

Vorstand der Abteilung:
Professor Dr. med. W. Lang

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO-KULTIVIERUNG HUMANPATHOGENER
PLASMODIENARTEN UND IHRER VERWENDUNG IM INDIREKTEN
IMMUNFLUORESZENZANTIKÖRPERTEST (IFAT)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximiliansuniversität zu München

vorgelegt von

Robert Pleier
aus
Bad Reichenhall

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

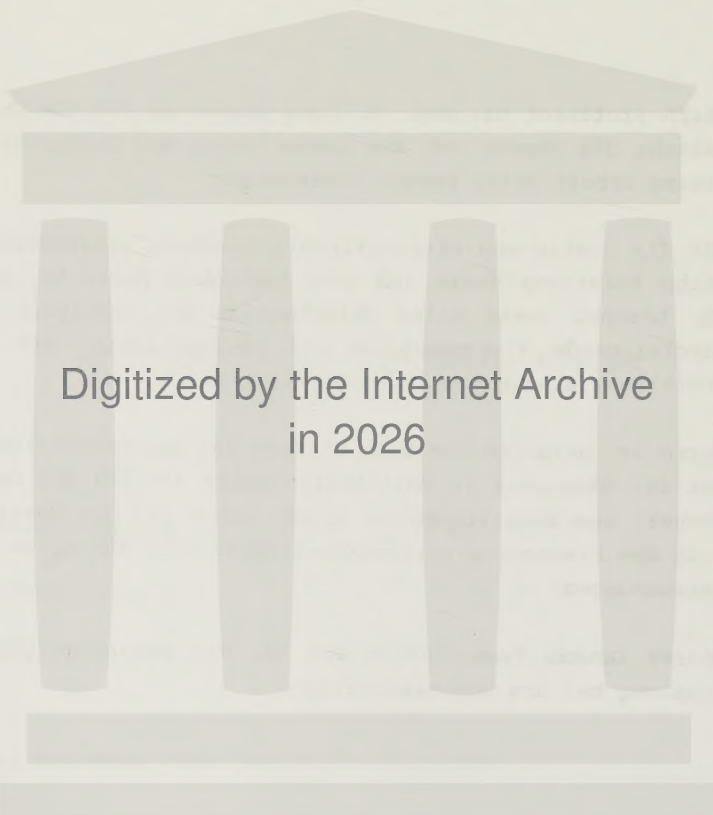
Tag der mündlichen Prüfung: 2.3.1964

Herrn Professor Dr. med. W. Lang danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter besten Bedingungen.

Für die stetig und einsatzfreudig gewährte wissenschaftliche Anleitung danke ich ganz besonders Herrn Dr. med. Th. Löscher sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Heidrich und Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried danke ich für die Gelegenheit zum Hospitieren in seinem Labor und die Überlassung des Plasmodium-falciparum-Stammes FCB1 für meine Untersuchungen.

Meiner Gattin Doris danke ich für die geduldige Unterstützung bei den Schreibarbeiten.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0085

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	7
3 MATERIAL UND METHODIK	8
3.1 Kulturverfahren	8
3.1.1 Petrischalen-Kultur	8
3.1.2 Kontinuierlicher Mediumdurchfluß	9
3.1.3 Medium	10
3.1.4 Serum	11
3.1.5 Erythrozyten	11
3.2 Arbeitsplatz	12
3.3 Parasiten	12
3.4 Gefrierverfahren	14
3.4.1 Methode A mit Glycerin/Sorbit als Gefrierschutzmittel	15
3.4.2 Methode B mit Glycerin/PBS als Gefrierschutzmittel	16
3.5 In-vitro-Resistenztest	17
3.6 Indirekter Immunfluoreszenzantikörper-test (IFAT)	18
4 ERGEBNISSE	20
4.1 Kultivierung von Plasmodium vivax	20
4.2 Kultivierung von Plasmodium ovale	20
4.3 Kultivierung einer Doppelinfektion mit Plasmodium vivax und Plasmodium falciparum	20
4.4 Kultivierung einer Doppelinfektion mit Plasmodium malariae und Plasmodium falciparum	20
4.5 Kultivierung von Plasmodium falciparum	22

	Seite
4.5.1	FrISChe Isolate von Patienten der Abteilung 22
4.5.2	Adaptierter Laborstamm 26
4.6	Vergleich im Wachstumsverhalten bei einem adaptierten Laborstamm und einem frischen Isolat 26
4.7	Vergleich im Wachstumsverhalten bei 12-stündigem und 24stündigem Mediumwechsel 28
4.8	Verwendung von Gentamycin im Medium 30
4.9	Versuche mit einer halbautomatischen Kulturmethode 31
4.10	Vergleich zwischen Gefrierverfahren 33
4.11	In-vitro-Resistenztest 33
4.12	Indirekter Immunfluoreszenzantikörper-test (IFAT) 34
4.12.1	Vergleich in der Titerhöhe zwischen Kulturantigen von Plasmodium falciparum und Antigen von tierpathogenen Plasmodienarten 34
4.12.2	Vergleich zwischen Schizontenantigen und gemischtem Antigen 37
5	DISKUSSION 40
5.1	Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Ergebnisse 40
5.2	Vergleich mit anderen Untersuchungen 42
5.3	Schlußfolgerungen 45
6	ZUSAMMENFASSUNG 47
7	LITERATURVERZEICHNIS 48
	LEBENS LAUF 54

Bis zum Jahr 1976 konnten die humanpathogenen Malariaparasiten, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae*, nur von infizierten Personen oder über Passagen durch splenektomierte *Aotus trivirgatus*-Affen erhalten werden. Die kontinuierliche Kultivierung von Malariaparasiten ist daher eine notwendige Voraussetzung für die Produktion von Parasitenmaterial in ausreichender Menge und Reinheit. Sie ist die Grundlage für weitere biochemische, serologische und immunologische Arbeiten. Mit dem in vitro gewonnenen Material können viele der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gesteckten Ziele der Malariaforschung in Angriff genommen werden, so z. B. Untersuchungen zum Metabolismus der Parasiten, zur Resistenzentwicklung, zum Wirkmechanismus der Chemotherapeutika, die Entwicklung neuer Arzneien und eventuell eines Impfstoffes, Studien zum Immunmechanismus, die Neu- und Weiterentwicklung immundiagnostischer Tests (40).

Die ersten Versuche, die erythrozytären Formen von Plasmodien in vitro zu züchten, waren von Bass und Johns (1) unternommen worden. Es konnte lediglich ein Zyklus bis zur Schizogonie beobachtet werden. Seitdem wurden viele weitere Versuche unternommen, die Parasiten in vitro über längere Zeit kontinuierlich zu kultivieren (2). Es gelang jedoch nicht, eine Vermehrung der Plasmodien zu erreichen, obwohl teilweise mehrere Zyklen verfolgt werden konnten. Trager und Jensen (35) und Haynes et al. (11) beendeten die jahrzehntelangen, erfolglosen Versuche, humanpathogene Plasmodienarten in vitro zu kultivieren, als es ihnen gelang, die erythrozytären Formen von *Plasmodium falciparum* in kontinuierlicher Kultur zu halten. Bei der Kultivierung von *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* konnte bisher kein vergleichbarer Durchbruch erzielt werden. Auch die in-vitro-Produktion

von Gametozyten von *Plasmodium falciparum* ist auf der Grundlage dieser Arbeiten möglich (5), doch es konnten noch keine Mücken von Kulturmateriel infiziert werden, noch konnten die Formen der in der Mücke ablaufenden Gamogonie kultiviert werden. Ebenso ist es noch nicht gelungen, Sporozoiten und exoerythrozytäre Formen der humanpathogenen Plasmodienarten in vitro zu kultivieren.

Die von Jensen und Trager (16) beschriebene Petrischalen-Kulturmethode hat sich weltweit durchgesetzt und erscheint trotz der Entwicklung halbautomatischer und automatischer Systeme (37) immer noch die geeignetste, um Variationen der Kulturbedingungen zu erproben (41). Bei dieser Methode werden die Parasiten in menschlichen Erythrozyten bei 37 - 38 °C unter verminderter Sauerstoffspannung inkubiert. Die Erythrozyten werden als dünne, auf dem Boden von Petrischalen liegende Schicht von einer dickeren Lage Nährmedium, bestehend aus dem Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 10 % Humanserum und Puffer, bedeckt. Die Verminderung der Sauerstoffspannung wird durch das Abbrennen einer Kerze im Glasexsikkator erreicht.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Kulturbedingungen zu optimieren:

Von Butcher (3, 4) und Zolg et al. (41) wurde nachgewiesen, daß im Gegensatz zur Ansicht von Trager und Jensen (35) mit einer kontinuierlichen Agitation der Kulturen, die die Erythrozyten in Suspension hält, erheblich bessere Ergebnisse erzielt werden als mit statischen Kulturen.

Von großer Bedeutung wäre - besonders für eine Massenproduktion von Parasiten - der Ersatz von Humanserum durch kommerziell erhältliche Tierseren oder andere Nährlösungen. Tierseren erbrachten durchweg unbefriedigende Wachstumsergebnisse (3, 12, 27). Frischgefrorenes gepooltes

Humanserum bringt optimale Ergebnisse, so daß der Serumanteil auf 5 % gesenkt werden kann (8), und ist jeder bisher ausgetesteten Humanserumfraktion und allen Tierseren überlegen (41).

Es besteht weiterhin die Notwendigkeit, mit menschlichen Spendererythrozyten zu arbeiten. Die extraerythrozytäre Kultur der erythrozytären Formen von Malariaerregern ist bisher lediglich bei Plasmodium lophurae (33) gelungen. Es wurde nachgewiesen, daß mit SAG (Saline, Adenin, Glukose) stabilisierte Erythrozytenkonzentrate besonders bei zunehmender Dauer der Lagerung dem mit CDP (Citrat, Dextrose, Phosphat) stabilisierten Vollblut überlegen sind (41). ACD- (Zitronensäure, Natriumcitrat, Dextrose) und CDP-Vollblut sind gleichwertig (37).

Die Sauerstoffspannung kann bei einem Kohlendioxyd-Anteil von 5 % und Stickstoff ad 100 % zwischen 3 % und 18 % liegen (3).

Es wurden verschiedene Methoden zur Gefrierkonservierung der parasitierten Erythrozyten entwickelt, wobei als Gefrierschutzmittel zumeist Glycerin oder Dimethylsulfoxyd (DMSO) verwendet werden (7). Die Hauptprobleme liegen in der hohen Hämolyserate beim Auftauen sowie im Absterben der reiferen Formen der Schizogonie.

Obwohl der direkte Erregernachweis bei akuter Malaria immer noch die Methode der Wahl ist, hat die Entwicklung spezifischer immunologischer Tests ihre Bedeutung zum Nachweis einer Infektion ohne zirkulierende Parasiten, zur retrospektiven Diagnose einer Malariainfektion, zur Entdeckung von Malaria bei Blutspendern, zur Differentialdiagnose des sogenannten tropischen Splenomegalie-syndroms und zur Epidemiologie der Malaria in endemischen Gebieten.

Zum Nachweis von Antikörpern im Serum von malarieiinfizierten Personen wurden verschiedene immunologische Methoden entwickelt (39). Der direkte Agglutinationstest, der in-vitro-Wachstumshemmungsassay, der direkte Immunfluoreszenztest und verschiedene Agargelmethode finden bei der experimentellen Laborarbeit Verwendung. Für Routineuntersuchungen wurden die Komplementbindungsreaktion (KBR), die indirekte Hämagglutination (IHA), der indirekte Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT), der enzymgebundene Immunoassay (ELISA) und der Radioimmunoassay (RIA) erprobt. IHA und IFAT fanden bisher die umfangreichste Anwendung. Der IFAT zeichnet sich gegenüber dem IHA durch schnelleren Titeranstieg in der ersten Phase einer primären Malariainfektion, durch höhere Titer im Verlauf der Infektion und durch die geringere Anzahl falschnegativer Seroreaktionen aus (22).

Es wurde nachgewiesen, daß der IFAT mit homologem Antigen die größte Sensitivität zeigt (32). Obwohl auf der Basis detaillierter Vergleiche zwischen verschiedenen Antigenen vorgeschlagen wurde, möglichst nur humanpathogene Plasmodienarten als Antigen zu verwenden (29), konnte diesem Postulat aus Mangel an Antigen bis zur Entwicklung der kontinuierlichen Kultivierung von *Plasmodium falciparum* nicht entsprochen werden. Wegen des hohen Grades an Kreuzreaktionen lieferten verschiedene tierpathogene Plasmodienarten, wie *Plasmodium gallinaceum* (19) und *Plasmodium fieldii* (21) geeignetes Antigen.

Rieckmann et al. (26) beschrieben eine auf der Petrischalenkulturmethode basierende Mikrotechnik, bei der anhand der Hemmung der Schizontenreifung von kurzzeitig in vitro kultivierten *Plasmodium-falciparum*-Parasiten durch Chloroquin in unterschiedlicher Dosierung eine Aussage über die Empfindlichkeit des Erregers für dieses Mittel gemacht werden kann. Es kann jedoch nicht zwischen den klinisch definierten Resistenzstadien differenziert werden.

Bei den serologischen Untersuchungen zum Antikörpernachweis bei den verschiedenen Malariaarten des Menschen wurden bislang tierpathogene Plasmodienarten als Antigen verwendet. Wie bereits angeführt, gelingt mit diesen Antigenen der Nachweis von Antikörpern in vielen Fällen, da aufgrund von Antigengemeinschaften Kreuzreaktionen auftreten. Für eine Anwendung der jetzt in Kultur vermehrbaren Erreger der Malaria tropica - *Plasmodium falciparum* - in der serologischen Routinediagnostik ist eine kontinuierliche Versorgung mit Parasitenmaterial bzw. Antigenen notwendig. Voraussetzung dazu ist die reproduzierbare Durchführung der Kulturmethode unter verschiedenen Bedingungen, die Lagerung der kultivierten Isolate und die Gewinnung verschiedener Antigene. Weiterhin stellt sich die Frage, ob bei verschiedenen *Plasmodium falciparum*-Stämmen antigenetische Unterschiede vorliegen und inwiefern sich diese auf die Immundiagnostik auswirken. Schließlich muß die Sensitivität und Spezifität des antigenen Materials überprüft werden.

Dazu sollten

1. Aufbau, Organisation und Durchführung der Kulturmethode an einem adaptierten Referenzstamm erprobt werden,
2. Verfahren zur Gefrierkonservierung und Lagerung verschiedener Isolate verglichen werden,
3. die Isolierung neuer Stämme von Malariapatienten der Abteilung versucht werden,
4. die in-vitro-Resistenzbestimmung bei verschiedenen Stämmen durchgeführt werden und
5. die Eignung verschiedener Stämme und Antigenzubereitungen zur serologischen Diagnostik mittels indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 KULTURVERFAHREN

3.1.1 Petrischalen-Kultur

Es wurde auf der von Jensen und Trager (16) beschriebenen Methodik basierend gearbeitet. Das aufbereitete parasitierte Blut (siehe 3.3) und die Spendererythrozyten (siehe 3.1.5), die als jeweils 5prozentige Suspension in komplettem Medium (KM) vorlagen, wurden in einem Verhältnis gemischt, daß sich eine circa 0,1prozentige Ausgangsparasitämie ergab. Es wurden vergleichende Untersuchungen mit unterschiedlichen Ausgangsparasitämien durchgeführt. Die Erythrozytensuspension wurde in 15-ml-Portionen in sterile 100 x 100-mm-Plastikpetrischalen mit Deckel verteilt. Die Schalen wurden in einen Exsiccator gestellt, eine rauch- und rußfreie Stearinkerze wurde im Exsiccator angezündet, der gutgefettete Exsiccatordeckel wurde bei geöffnetem Hahn aufgesetzt. Nach Erlöschen der Flamme wurde der Hahn geschlossen. Es entsteht dabei eine Atmosphäre von ca. 3 % CO₂ : 18 % O₂ : 79 % N₂ (35). Zusätzlich wurde aus einer Prüfgasflasche über einen 0,2-µ-Millipore®-Filter ein Gasgemisch von 90 % N₂ : 5 % O₂ : 5 % CO₂ zugeleitet, um die Kulturen vor einem Anstieg der Sauerstoffspannung durch eventuelle Undichtigkeiten des Systems zu schützen.

Die Kulturen wurden bei 38 °C im Brutschrank inkubiert. Es kam somit eine dünne Schicht Erythrozyten (ca. 100 - 150 µm) auf dem Boden der Petrischalen zu liegen und wurde bedeckt von einer 2 - 3 mm tiefen Schicht Medium.

Das Medium wurde durch Abpipettieren des Überstands und Zugabe von 15 ml frischem KM gewechselt. Der Mediumwechsel wurde bis Mai 1982 einmal täglich, danach zweimal täglich vorgenommen (3). Wachstumsergebnisse bei 12stün-

digem und 24stündigem Mediumwechsel wurden verglichen. Nach jedem Mediumwechsel wurden die Kulturen durch vorsichtige Agitation in Suspension gebracht und eine Probe zur Auwertung entnommen: Es wurden Ausstriche angefertigt und mit einer modifizierten Giemsaefärbung gefärbt. Unter 400facher bis 1.000facher Vergrößerung wurde die Zahl der parasitierten Erythrozyten - aufgeschlüsselt in Ringe, Trophozoiten, Schizonten und Gametozyten - pro 10.000 Erythrozyten bestimmt.

Subkulturen wurden entsprechend dem Parasitenwachstum mit frisch aufbereitetem Spenderblut angelegt, bei optimalem Wachstum alle 48 Stunden, bei geringem Wachstum alle sechs bis acht Tage. Es wurde jeweils wieder auf eine Ausgangsparasitämie von ca. 0,1 % verdünnt.

3.1.2 Kontinuierlicher Mediumdurchfluß

Mit den Stämmen FCMc6 und FCMc8 wurde der Versuch einer Anzucht, basierend auf der von Trager (34) beschriebenen Methode, unternommen. Es wurden 10 ml Erythrozytensuspension in ein Flachboden-Glasgefäß mit drei obenliegenden Zugängen eingebracht. Über eine Rollpumpe wurden 50 ml KM pro 24 Stunden zugeleitet und an einem distalen Zugang wieder abgepumpt. Über einen 0,2-µ-Millipore[®]-Filter wurde aus einer Prüfgasflasche ein Gemisch von 90 % N₂ : 5 % O₂ : 5 % CO₂ eingeleitet, dessen Zustrom über eine mit aqua destillata gefüllte Flasche auf eine Blase pro Sekunde eingestellt wurde. Es wurden täglich Proben für Ausstriche entnommen.

3.1.3 Medium

Das Medium wurde folgendermaßen hergestellt:

- Einwiegen von 10,4 g RPMI 1640 der Firma Serva mit L-Glutamin ohne Bicarbonat in 1.000 ml aqua ad injectabilia
- Einwiegen von 2,0 g NaHCO_3
- Einwiegen von 5,94 g HEPES-Puffer der Firma Serva
- Einwiegen von 20 mg Gentamycinsulfat

Für einen Wachstumsvergleich wurde Medium mit und ohne Zusatz von 75 mg Gentamycin pro Liter verwendet.

- Zugabe von 5 ml L-Glutamin 200 mM
- Einstellen des pH auf 7,2 mit 1 n NaOH

Diese Mischung wurde als inkomplettes Medium (IK) bezeichnet.

- Sterilfiltrieren durch 0,2- μ -Filter, entweder Nalge-ne[®] oder Millipore[®]
- Aufbewahren in sterilen Schraubverschlußgläsern bei ca. 6 °C im Kühlschrank bis zu vier Wochen

Nach Bedarf wurde zu komplettem Medium (KM) ergänzt:

- Abschütten von 100 ml IK
- Zugabe von 100 ml Serum
- erneutes Filtrieren durch 0,2- μ -Filtereinheiten
- Aufbewahren bis zu einer Woche im Kühlschrank bei 6 °C in sterilen Schraubverschlußgläsern
- Erwärmen auf 37 °C im Wasserbad vor Gebrauch.

3.1.4 Serum

Von der Blutbank München des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) wurde Serum aus 500 ml Vollblut, das ohne Stabilisator abgenommen worden war, in ASID[®]-Serumflaschen mit 5 ml NaCl (0,85prozentig) bezogen. Das Serum wurde spätestens 24 Stunden nach Abnahme in 50-ml-Portionen in sterile Plastik-Schraubgefäße abgefüllt, bei -20 °C eingefroren und beliebig lange Zeit gelagert.

Zur Anzucht neuer Kulturen aus Patientenblut mit zunächst unbekannter Blutgruppe wurde universell verwendbares AB-Rh-pos. Serum bereitgehalten. Zur Aufrechterhaltung etablierter Kulturen wurde jeweils kompatibles Serum verwendet.

3.1.5 Erythrozyten

Ebenfalls von der BRK-Blutbank wurde ACD-stabilisiertes Vollblut in 500-ml-Plastikblutbeuteln bezogen. Das Blut wurde im Kühlschrank bis zu vier Wochen aufbewahrt und nach Möglichkeit erst einige Tage nach der Abnahme verwendet (37). Solange die Blutgruppe des Patientenblutes noch nicht bekannt war, wurde 0-Rh-neg. Blut bereitgehalten, später wurde jeweils kompatibles Blut verwendet.

Das Blut wurde folgendermaßen aufbereitet:

- Abfüllen in sterile 50-ml-Plastikschraubgefäße
- Zentrifugieren bei Raumtemperatur für zehn Minuten bei 2.000 g
- Absaugen des Überstandes
- Mischen der Erythrozyten mit gleichem Volumen IK
- Zentrifugieren wie oben

Dieses Waschen der Erythrozyten wurde noch je einmal mit IK und KM wiederholt.

- Herstellen einer 5prozentigen Erythrozytensuspension in KM
- Abfüllen in sterile Schraubverschlußgläser

Aufbereitetes Blut wurde sofort verbraucht, nicht gelagert.

3.2 ARBEITSPLATZ

Von November 1979 bis Juli 1982 wurden die Arbeiten in einem bakteriologischen Routinelabor durchgeführt. Es stand keine Sterilbank zur Verfügung. Es wurden Kühl- und Blutschränke mitbenutzt, die zugleich für bakteriologische Untersuchungen benutzt wurden.

Von Juli 1982 an wurde in einer Sterilbank mit horizontalem Laminarstrom gearbeitet, und die Kulturen wurden in einem separaten Brutschrank inkubiert.

3.3 PARASITEN

Zwischen November 1979 und August 1982 wurde Patienten der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Universität München mit parasitologisch nachgewiesener Malaria jeweils 10 ml parasitierten Blutes in heparinisierten Spritzen steril abgenommen. Das Blut wurde innerhalb der ersten Stunden nach Abnahme analog dem Spenderblut (siehe 3.1.5) aufbereitet, nachdem es bei 37 °C im Brutschrank gelagert worden war. Es handelte sich um elf Monoinfektionen mit *Plasmodium falciparum*, eine Monoinfektion mit *Plasmodium vivax*, eine Monoinfektion mit *Plasmodium ovale*, eine Doppelinfektion mit *Plasmodium falcipa-*

rum und *Plasmodium vivax* und eine Doppelinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae*.

In Tabelle 1 sind für die einzelnen Stämme Datum der Isolation, Ausgangsparasitämie, Herkunftsland und Angaben zum Behandlungsverlauf aufgeführt. In der Nomenklatur wurde einem Vorschlag von Jensen und Trager (17) gefolgt.

Von Herrn Dr. Heidrich vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried wurde der Stamm FCB 1 aus Kolumbien überlassen. Dieser Stamm war bei der Übernahme bereits seit mehr als einem Jahr an die in-vitro-Kultur adaptiert.

TABELLE 1

Stamm	Erreger	Herkunft	Datum	Ausgangs- parasitämie	Vorbehandlung
FCMc 1	Pl. falc.	Kambodscha	21.02.80	0,1 %	nicht anbehandelt
FCMc 2	Pl. falc.	Kambodscha	26.02.80	2,5 %	nicht anbehandelt
FCMc 3	Pl. falc.	Thailand	04.03.80	0,5 %	Rezidiv nach ungenügender Behandlung; bei Abnahme nicht anbe- handelt
FCMc 4	Pl. falc.	Thailand	04.03.80	1 %	Rezidiv nach ungenügender Behandlung; bei Abnahme nicht anbe- handelt
FCMc 5	Pl. falc.	Äthiopien	29.07.80	1,5 %	nicht anbehandelt
FCMc 6	Pl. falc.	Tansania	13.05.81	0,15 %	angeblich volle Prophy- laxe; kli- nisch keine Resistenz
FCMc 7	Pl. falc.	Kenya	02.11.81	0,1 %	nicht anbehandelt

TABELLE 1 (Fortsetzung)

Stamm	Erreger	Herkunft	Datum	Ausgangs- parasitämie	Vorbehandlung
FCMc 8	Pl. falc.	Nigeria	10.07.81	2,0 %	nicht anbehandelt
FCMc 9	Pl. falc.	Ruanda	28.09.81	0,45 %	1. Rezidiv bei Resi- stenzgrad I; bei Abnahme nicht anbe- handelt
FCMc 10	Pl. falc.	Kenya	14.01.82	1,0 %	2. Rezidiv bei Resi- stenzgrad I; bei Abnahme nicht anbe- handelt
FCMc 11	Pl. falc.	Sierra Leone	02.08.82	0,2 %	nicht anbehandelt
VCMc 1	Pl. viv.	Philippinen	26.11.79	0,15 %	1. Rezidiv; nicht anbehandelt
OCMc 1	Pl. ov.	Kamerun	27.11.79	0,2 %	nicht anbehandelt
FVCMc 1	Pl. falc. +Pl. viv.	Vietnam	06.03.80	0,1 % 1,0 %	nicht anbehandelt
FMCMc 1	Pl. falc. +Pl. mal.	Kenya	26.08.82	4,0 %	nicht anbehandelt

3.4 GEFRIERVERFAHREN

Es wurden zwei Verfahren zur Gefrier Aufbewahrung angewandt: Methode A nach Jensen et al. (18) und Methode B nach Heidrich (persönliche Mitteilung).

3.4.1 Methode A mit Glycerin/Sorbit als Gefrierschutzmittel

Einfrieren:

Aus 70 ml Glycerin (99 % reinst) und 180 ml Sorbit (4,2-prozentig in 0,9prozentiger NaCl) wurde das Gefrierschutzmittel hergestellt, das nach Sterilfiltration durch 0,2- μ -Filter bei ca. 6 °C im Kühlschrank für beliebige lange Zeit aufbewahrt wurde.

Nach dem Ernten von parasitiertem Blut aus den Petrischalenkulturen mit großen Gummikopfpipetten in sterile 50-ml-Schraubverschlußgefäße wurde folgendermaßen verfahren:

- Zentrifugieren für zehn Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes
- Zugabe von gleichem Volumen Gefrierschutzmittel zu den verbleibenden Erythrozyten
- Äquilibrieren für fünf Minuten
- Abfüllen von 0,5 - 1-ml-Portionen in sterile nunc[®]-Gefriergefäße
- Versenken in flüssigem Stickstoff an Gefrierstangen
- Lagerung für unbegrenzte Zeit

Auftauen:

- Eintauchen der Gefriergefäße in das 37-°C-Wasserbad
- Zentrifugieren bei 500 g für sieben Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen und Verwerfen des Gefrierschutzmittelüberstandes
- Mischen mit KM im Überschuß
- Zentrifugieren wie oben
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes

- nochmaliges Waschen in KM
- Herstellen einer 5prozentigen Suspension in KM

Diese Suspension wurde mit Spendererythrozyten (siehe 3.1.5) in geeignetem Verhältnis gemischt und inkubiert.

3.4.2 Methode B mit Glycerin/PBS als Gefrierschutzmittel

Einfrieren:

Als Gefrierschutzmittel wurde 20 % Glycerin (87prozentig) in PBS (pH 7,2 - 7,4) verwendet. Es wurde steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dem Ernten des parasitierten Blutes wurden folgende Arbeitsgänge durchgeführt:

- Zentrifugieren bei 2000 g für zehn Minuten bei Raumtemperatur
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes
- Mischen der Erythrozyten mit KM im Verhältnis 1 : 1
- Mischen der so erhaltenen Mischung mit Gefrierschutzmittel im Verhältnis 1 : 1
- Abfüllen in 2-ml-Portionen in sterile nunc[®]-Gefriergefäße
- schnelles Versenken im flüssigen Stickstoff
- Lagerung für unbegrenzte Zeit

Auftauen:

- Auftauen der 2-ml-Portionen im Eis
- Umfüllen in sterile 50-ml-Schraubverschlußgefäße
- Ausspülen der Gefriergefäße mit 2 ml NaCl 8prozentig, 6 ml NaCl 1,6prozentig und 30 ml PBS (alle drei Lösungen eisgekühlt)

- Zentrifugieren für fünf Minuten bei 500 g bei 4 °C bzw. im Eiswasserbad
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes
- Herstellen einer 5prozentigen Suspension in KM

Diese Suspension wurde mit Spendererythrozyten (siehe 3.1.5) in geeignetem Verhältnis gemischt und inkubiert.

3.5 IN-VITRO-RESISTENZTEST

In modifizierter Form wurde der von Rieckmann et al. (26) beschriebene in-vitro-Mikrotest an den Stämmen FCMc 11, FCMc 1 und FCB 1 erprobt und als Standardmethode etabliert.

96-Loch-Mikrotiterplatten von nunc[®] wurden mit folgenden Chloroquindisulfat-Mengen beimpft:

A	=	Kontrolle			
B	=	0,25 ng	Chloroquindisulfat		
				pro Loch	≐ 0,1 nmol/ml Blut
C	=	0,50 ng	"	"	≐ 0,2 nmol/ml Blut
D	=	1,00 ng	"	"	≐ 0,4 nmol/ml Blut
E	=	2,00 ng	"	"	≐ 0,8 nmol/ml Blut
F	=	3,00 ng	"	"	≐ 1,2 nmol/ml Blut
G	=	4,00 ng	"	"	≐ 1,6 nmol/ml Blut
H	=	8,00 ng	"	"	≐ 3,2 nmol/ml Blut

Der Test wurde angesetzt mit 50 µl pro Loch an aufbereitetem parasitiertem Blut (siehe 3.3) als 10prozentiger Suspension in KM. Die Kulturplatten wurden mit passendem Deckel verschlossen und wie Petrischalenkulturen inkubiert (siehe 3.1.1). Nach 24 Stunden bzw. wenn im Kontrollloch Schizontenreifung einsetzte, wurde der Test abgelesen: Es wurden Ausstriche angefertigt, mit Diff-

Quick[®]-Schnellfärbung gefärbt und unter 400facher Vergrößerung wurde die Zahl der Schizonten pro 10.000 Erythrozyten bestimmt.

Komplette Hemmung der Schizontenreifung bei 1,0 nmol/ml Blut bedeutet volle Empfindlichkeit für Chloroquin, während Schizontenreifung über 1,2 nmol/ml Blut ein Zeichen für Resistenz ist (20).

3.6 INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZANTIKÖRPERTEST (IFAT)

Die Stämme FCB 1 und FCMc 1 wurden als Antigen im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) verwendet. Bei allen untersuchten Seren war zuvor ein IFAT mit Antigen von *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium fieldii* durchgeführt worden. Bei einem Teil der Seren wurde Schizontenantigen mit gemischtem Antigen verglichen.

Zur Herstellung von Schizontenantigen wurde parasitiertes Blut aus den Petrischalenkulturen bei möglichst hohem Anteil von Schizonten (ca. 65 %) bei einer Gesamtparasitämie von ca. 6 % geerntet. Mit dem Kulturmaterial wurde in Anlehnung an die von Jensen (13) beschriebene Physiogelmethode eine Plasmagelanreicherung durchgeführt. Dabei wurde eine ca. 30prozentige Parasitämie mit ca. 90prozentigem Schizontenanteil erzielt. Gemischtes Antigen wurde bei etwa gleichen Anteilen von Ringformen, Trophozoiten und Schizonten geerntet. Das Kulturmaterial wurde dreimal in PBS (pH 7,2 - 7,4) gewaschen und 20prozentig eingestellt. Die Suspension wurde als dünner Film auf 12-Loch-Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet, zur Aufbewahrung bei -20 °C in Plastikfolie mit Kieselgel verschweißt und zur Verwendung noch mit dem Feuchtigkeitsschutz bei Raumtemperatur wieder erwärmt.

Es wurden 38 Seren von Patienten der Abteilung mit parasitologisch nachgewiesener Malaria aus den Jahren 1979 - 1982 getestet, wobei es sich um 15 Infektionen mit *Plasmodium falciparum*, zehn mit *Plasmodium vivax*, fünf mit *Plasmodium malariae* und drei mit *Plasmodium ovale* sowie drei Doppelinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* und zwei Doppelinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* handelte. Zum Vergleich zwischen Schizontenantigen und gemischtem Antigen wurden 35 Seren verwendet, davon fünf mit parasitologisch nachgewiesener Infektion mit *Plasmodium vivax* und zehn mit *Plasmodium falciparum* sowie 20 Seren von der Blutbank von Personen, die nie das tropische Ausland besucht hatten. Die Seren waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bis zu 48 Monaten bei -20 °C gelagert worden.

In Mikrotiterplatten wurden Verdünnungsreihen aus den Patientenserum und PBS mit Mikrodilutoren in den Reihen 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256 und 1 : 512 hergestellt und je 10 µl der Verdünnungen auf Objektträger gegeben. Die Träger wurden 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert, dreimal mit PBS je fünf Minuten gewaschen und anschließend mit Filterpapier getrocknet. Dann wurden je 10 µl einer 1 : 200-Verdünnung (in PBS mit 0,1 % Evans-blue) von Fluoreszin-markiertem Antihuman-IgG (Pasteur) vom Kaninchen auf die Antigenfelder aufgetragen.

Nach erneuter 30minütiger Inkubation bei 37 °C in der feuchten Kammer wurden die Objektträger dreimal in PBS und zweimal in aqua destillata gewaschen. Nach dem Trocknen wurde mit Glycerinpuffer eingedeckt und in einem Leitz-Orthoplan-Fluoreszenzmikroskop bei Anregungsfrequenz 366 nm von zwei Untersuchern unabhängig voneinander abgelesen. Die letzte Verdünnungsstufe mit eindeutiger Fluoreszenz wurde als Endtiter angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 KULTIVIERUNG VON PLASMODIUM VIVAX

Der Stamm VCMc 1 wurde in der für Plasmodium falciparum beschriebenen Methodik in Kultur gebracht. Schon beim ersten Kontrollausstrich sowie bei allen weiteren ließen sich keine intakten Parasiten nachweisen. Der Kulturversuch wurde nach neun Tagen eingestellt.

4.2 KULTIVIERUNG VON PLASMODIUM OVALE

Der Kulturversuch mit dem Stamm OCMc 1 wurde nach acht Tagen eingestellt. Es hatten sich in keinem Kontrollausstrich je intakte Parasiten nachweisen lassen.

4.3 KULTIVIERUNG EINER DOPPELINFEKTION MIT PLASMODIUM VIVAX UND PLASMODIUM FALCIPARUM

Bei dem Stamm FVCMc 1 wurde versucht, eine Doppelinfektion mit Plasmodium vivax und Plasmodium falciparum zu kultieren. Der Versuch wurde nach zehn Tagen eingestellt, nachdem sich in den Kontrollausstrichen niemals intakte Parasiten gezeigt hatten.

4.4 KULTIVIERUNG EINER DOPPELINFEKTION MIT PLASMODIUM MALARIAE UND PLASMODIUM FALCIPARUM

Mit dem Stamm FMCMc 1 wurde eine Doppelinfektion mit Plasmodium falciparum und Plasmodium malariae in die in-vitro-Kultur gebracht. Eindeutige Bandformen, beweisend für das Vorhandensein von Plasmodium malariae, ließen sich nach dem fünften Tag in Kultur in den Ausstrichen nicht mehr nachweisen, so daß davon ausgegangen werden

muß, daß es sich im weiteren Verlauf um eine Plasmodium-falciparum-Monokultur handelte.

In Tabelle 2 ist das Wachstumsverhalten des Stammes FMCMc 1 während der ersten sieben Tage in Kultur dargestellt. Der Stamm wurde am achten Tag nach Methode B (siehe 3.4.2) eingefroren und nach dem Auftauen erfolgreich weiter kultiviert.

TABELLE 2

Stamm: FMCMc 1

Tage in Kultur	Parasiten pro 10.000 Erythrozyten					
	V	S	R	T	Sc	G
1	2	231	220	3	8	-
2		226	85	135	6	-
3		485	380	80	25	2
4		920	610	240	70	4
5		1.020	550	180	290	6
6	9	500	370	95	35	5
7		855	680	110	65	7

V = Verdünnungsfaktor
S = Summe
R = Ringe
T = Trophozoiten
Sc = Schizonten
G = Gametozyten

4.5 KULTIVIERUNG VON PLASMODIUM FALCIPARUM

4.5.1 Frische Isolate von Patienten der Abteilung

Bei den Stämmen FCMc 3, FCMc 5 und FCMc 7 konnten in Kontrollausstrichen nie Schizonten nachgewiesen werden. Während der ersten Tage in Kultur fanden sich noch wenige denaturierte Ringformen. Die Kulturen wurden nach bis zu 18 Tagen parasitenfreier Kontrollausstriche eingestellt. FCMc 10 wurde nach erfolglosem Kulturversuch nach 17 Tagen wegen Kontamination eingestellt.

In Tabelle 4 ist das Wachstumsverhalten der Stämme FCMc 1, FCMc 2, FCMc 4, FCMc 8 und FCMc 9 während der jeweils ersten zehn Tage in Kultur mit zum Teil unterschiedlichen Ausgangsverdünnungen dargestellt. Die Kultivierung dieser Stämme wurde zwischen dem 10. und 18. Tag eingestellt, nachdem die Kontrollausstriche zwischen einem und 14 Tagen frei von vermehrungsfähigen Parasiten gewesen waren (siehe Tabelle 3).

TABELLE 3

Stamm	Laufzeit des Kulturversuchs in Tagen	Tage ohne Parasitennachweis bis zum Abbruch der Kultur
FCMc 1	16	9
FCMc 2	10	6
FCMc 4	18	14
FCMc 8	10	1
FCMc 9	14	8

FCMc 11 mußte nach neun Tagen wegen Kontamination aller Schalen eingestellt werden (siehe Tabelle 5).

TABELLE 4 (Fortsetzung)

AV = Ausgangsverdünnung; V = Verdünnungsfaktor; S = Summe; R = Ringe; Sc = Schizonten; T = Trophozoiten; G = Gametozyten

Tage in Kultur	Parasiten pro 10.000 Erythrozyten											
	Stamm: FCMc 4						Stamm: FCMc 4					
	AV:	1 : 1					AV:	1 : 5				
	V	S	R	Sc	T	G	V	S	R	Sc	T	G
1	1	2	1	0	1	0	1	3	0	2	1	0
2		2	1	0	0	1		2	0	1	0	1
3		2	1	0	0	1		2	2	0	0	0
4		1	0	0	1	0		1	0	0	1	0
5		1	0	1	0	0		2	0	0	1	1
6		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
7		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
8	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
9		0	0	0	0	0		1	0	0	0	1
10		0	0	0	0	0		0	0	0	0	0

	Stamm: FCMc 8						Stamm: FCMc 9					
	V	S	R	Sc	T	G	V	S	R	Sc	T	G
1	2	20	15	0	5	0	2	44	41	3	0	0
2		-	-	-	-	-		18	10	0	8	0
3	4	-	-	-	-	-		70	20	8	42	0
4		84	16	8	60	0		54	16	0	38	0
5		-	-	-	-	-		58	14	4	12	28
6		-	-	-	-	-		28	0	3	9	16
7	10	10	5	4	1	0		10	0	0	0	10
8		-	-	-	-	-		6	0	0	0	6
9		7	4	2	1	0		0	0	0	0	0
10		5	3	1	1	0		0	0	0	0	0

FCMc 6, dessen Wachstumsverhalten in Tabelle 5 dargestellt ist, wurde nach 19 Tagen in Kultur verloren, da zur Mediumherstellung versehentlich Plasma statt Serum verwendet worden war.. Trotz Zugabe von Heparin agglutinierten die Erythrozyten irreversibel, so daß die Kulturen nicht weitergeführt werden konnten.

TABELLE 5

V = Verdünnungsfaktor; S = Summe; R = Ringe; Sc = Schizonten; T = Trophozoiten; G = Gametozyten

Tage in Kultur	Parasiten pro 10.000 Erythrozyten											
	Stamm: FCMc 11						Stamm: FCMc 6					
	V	S	R	Sc	T	G	V	S	R	Sc	T	G
1	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
2		75	5	70	0	0	29	19	7	3	0	
3	2	123	100	3	20	0	57	54	0	3	0	
4		247	12	40	160	35	-	-	-	-	-	
5		220	180	15	5	20	142	120	6	8	8	
6		230	50	5	150	25	93	69	6	15	3	
7		680	600	50	10	20	60	32	12	16	0	
8	4	485	290	10	180	5	190	170	0	20	0	
9		345	180	150	15	0	12	27	6	0	21	0
10		Kontamination						-	-	-	-	-
11							15	5	10	0	0	
12							80	75	0	5	0	
13							30	25	5	0	0	
14							42	10	4	6	0	0
15							32	25	0	7	0	
16							33	15	5	10	3	
17							-	-	-	-	-	
18							60	40	8	13	15	4
19							64	46	10	8	0	
20							Erythrozyten agglutiniert					

4.5.2 Adaptierter Laborstamm

Tabelle 6 zeigt das Wachstumsverhalten des Stammes FCB 1 bei den beiden ersten Kulturversuchen, die nach 14 bzw. 16 Tagen wegen Kontamination eingestellt werden mußten, im Vergleich dazu einen kontaminationsfreien Wachstumsverlauf. (Tabelle 6 siehe nächste Seite.)

4.6 VERGLEICH IM WACHSTUMSVERHALTEN BEI EINEM ADAPTIERTEN LABORSTAMM UND EINEM FRISCHEN ISOLAT

In Tabelle 7 wird das Wachstum des adaptierten Laborstammes FCB 1 mit dem eigenen Isolat FMCMc 1 jeweils während der ersten zehn Tage in Kultur nach dem Auftauen verglichen. FCB 1 befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits seit Jahren in in-vitro-Kultur, während FMCMc 1 nach siebentägiger Adaptation mit anschließendem Einfrieren erstmals wieder aufgetaut wurde. Beide Stämme waren identischen Kulturbedingungen unterworfen.

Es zeigt sich ein deutlich schnelleres Wachstum bei dem adaptierten Laborstamm FCB 1.

TABELLE 6

V = Verdünnungsfaktor; S = Summe; R = Ringe; Sc = Schizonten; T = Trophozoiten

Tage in Kultur	Parasiten pro 10.000 Erythrozyten															
	V	S	R	Sc	T	V	S	R	Sc	T	V	S	R	Sc	T	
2	5	1	1	1	0	0	51	51	0	0	2,5	10	10	0	0	
3		-	-	-	-	-	34	24	6	4		12	4	0	8	
4		1	0	1	0	0	190	150	5	35		92	80	0	12	
5		1	1	0	0	0	245	230	15	0		7,5	40	32	0	8
6		1	0	1	0	0	149	10	14	125			40	17	0	23
7		6	5	1	0	0	585	540	30	15		290	200	70	20	
8		22	8	12	2	2	620	20	20	680		690	500	10	180	
9		90	55	25	10	0	1.015	1.000	10	5	22,5	955	850	90	15	
10		80	15	15	50	0	1.100	440	340	320		1.130	540	10	580	
11	23	60	45	7	8	0	1.835	1.600	25	210	45	2.015	1.800	200	15	
12		135	55	55	25	0	1.050	300	50	700	90	840	380	10	450	
13		265	200	5	60	0	-	-	-	-	1.220	600	580	40	30	
14		610	160	400	50	0	520	400	40	80	900	195	150	15	60	
15	270	1.180	850	80	250	0	Kontamination					590	500	30		
16		150	90	50	10	0	Kontamination									
17		570	300	30	240	0										
18	2.160	280	240	20	20	0										
19		915	720	15	180	0										
20	21.600	600	490	50	60	0										

TABELLE 7

V = Verdünnungsfaktor; S = Summe; R = Ringe; T = Trophozoiten; Sc = Schizonten

Tage in Kultur	Parasiten pro 10.000 Erythrozyten									
	Stamm: FCB 1					Stamm: FMCMc 1				
	V	S	R	T	Sc	V	S	R	T	Sc
2	5	9	8	0	1	5	3	2	0	1
3		100	60	15	25		25	25	0	0
4		335	270	30	35		42	30	8	4
5	45	75	40	10	20		71	60	3	8
6		350	280	30	40		58	45	10	3
7		980	580	160	240		96	70	18	8
8		690	100	320	270		187	130	45	12
9		30	20	0	10		345	280	35	30
10	135	35	20	10	5	15	315	250	30	35

4.7 VERGLEICH IM WACHSTUMSVERHALTEN BEI 12-STÜNDIGEM UND 24-STÜNDIGEM MEDIUMWECHSEL (MW)

Es wurden bei zwei Linien des Stammes FCB 1 die Parasitämien am jeweils elften Tag nach dem Beginn einer Kultur gleich 100 % gesetzt. Bei beiden Linien war während der Tage 0 bis 10 der Mediumwechsel (MW) in 12stündigem Intervall durchgeführt worden. In Abbildung 1 ist das Wachstumsverhalten bei 12stündigem (x—x = Linie A) und 24stündigem (·—· = Linie B) Mediumwechsel dargestellt.

Es zeigen sich annähernd parallele Wachstumskurven für beide Linien bis zum zweiten Tag des Versuchs mit 24stündigem Mediumwechsel bei Linie B. Der Versuch wurde nach fünf Tagen abgebrochen, als ein Verlust der Linie B wegen der sinkenden Parasitämie drohte. Am zweiten Tag nach Wiedereinführung des 12stündigen Mediumwechsels konnte wieder ansteigende Parasitämie bei Linie B beobachtet werden.

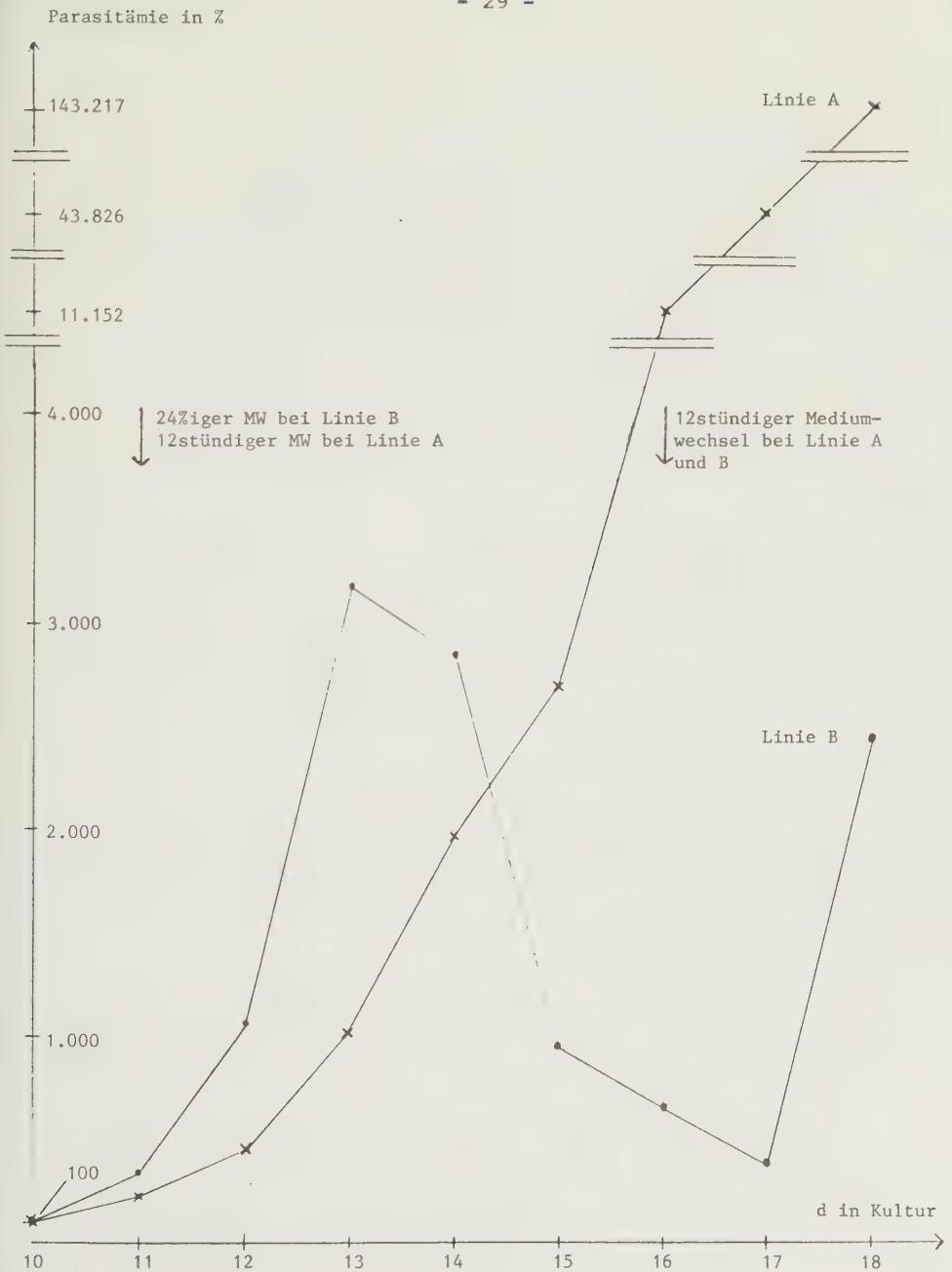


Abbildung 1

4.8

VERWENDUNG VON GENTAMYCIN IM MEDIUM

In den Abbildungen 2 und 3 ist das Wachstumsverhalten von jeweils zwei Linien des Stammes FCMc 6 gegenübergestellt. Bei den beiden mit G bezeichneten Linien wurden 75 mg Gentamycin pro 1.000 ml Medium zugesetzt, während ansonsten identische Kulturbedingungen herrschten.

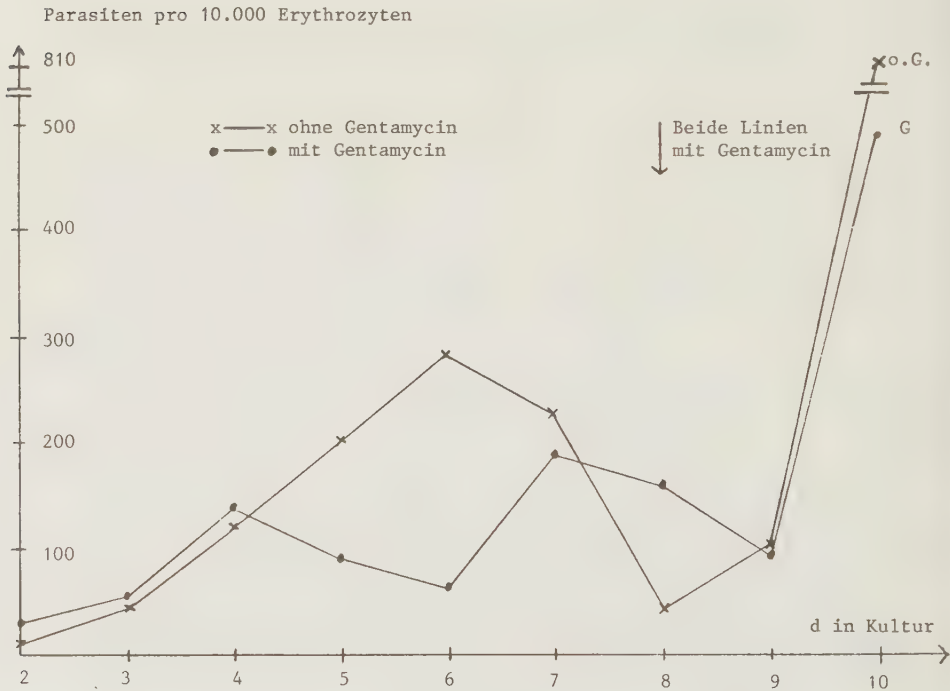


Abbildung 2

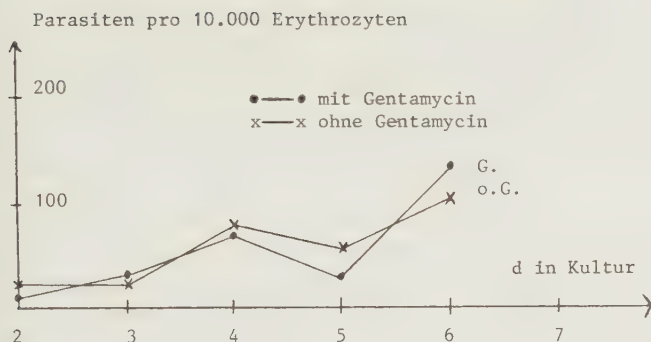


Abbildung 3

Nachdem sich in den beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Kulturen mit und ohne Gentamycinzusatz zum Medium ergeben hatten, wurden nach acht Tagen in Kultur beide Linien mit Nährmedium mit Gentamycinzusatz weitergeführt.

Von den Schalen ohne Gentamycinzusatz wurden bis zum siebten Kulturtag 50 % durch Kontamination verloren, während keine der Schalen mit antibiotischem Zusatz kontaminierte. Vom achten Tag an wurden alle Schalen mit Gentamycinzusatz weiter kultiviert.

4.9 VERSUCHE MIT EINER HALBAUTOMATISCHEN KULTURMETHODE

In Abbildung 4 wird das Wachstumsverhalten des Stammes FCMc 6 dargestellt, nachdem bei einer Subkultivierung ein Teil des Materials in ein halbautomatisches Kultursystem mit kontinuierlichem Mediumdurchfluß gebracht worden war, im Vergleich mit dem Wachstum des Restmaterials in der Petrischalenkultur. Der Stamm hatte sich bis dahin zehn Tage in Kultur befunden.

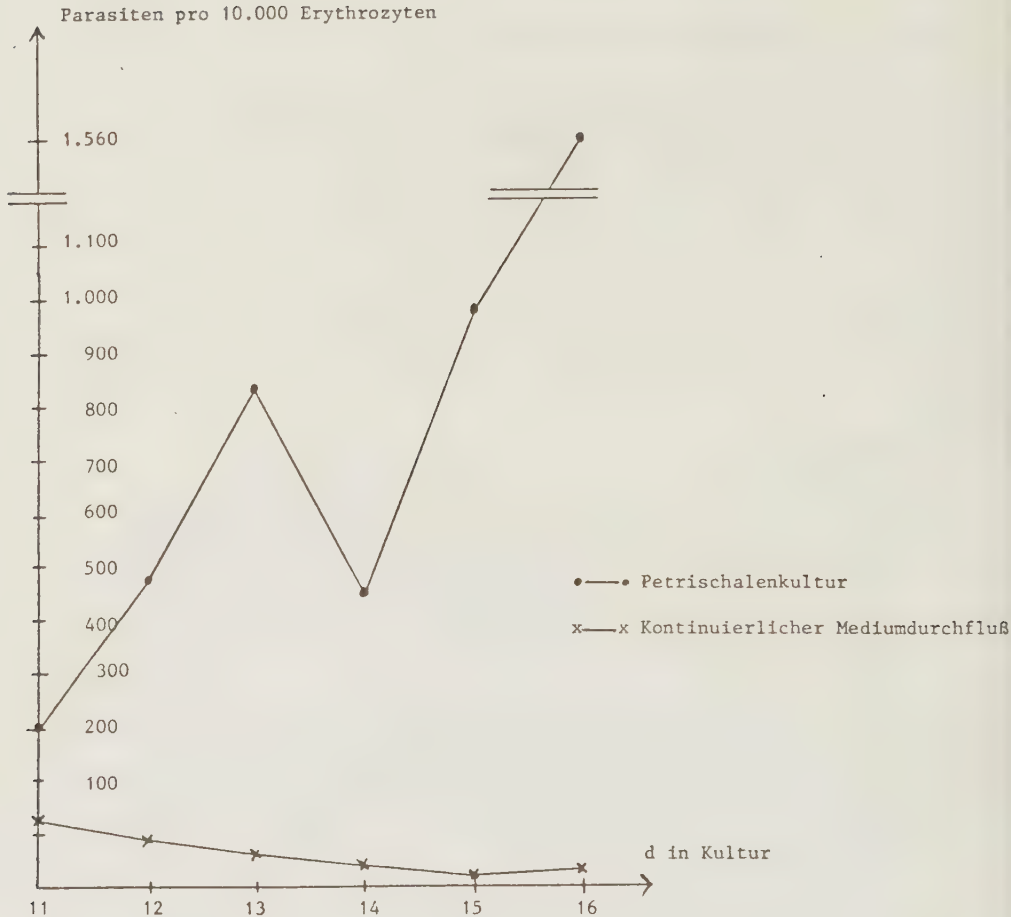


Abbildung 4

In den Ausstrichen aus der halbautomatischen Kulturanordnung ließen sich lediglich denaturierte Schizonten nachweisen, auch die Gesamtparasitämie zeigte keine Zunahme. In den Petrischalenkulturen zeigte sich eine Zunahme der Parasitämie mit einem bis zu 30prozentigen Anteil an Schizonten.

Bei einem zweiten Versuch mit dieser Kulturmethode mit dem Stamm FCMc 8, dessen Wachstumsverhalten in Petrischalenkulturen in Tabelle 4 dargestellt ist, konnten nie Schizonten im Ausstrich nachgewiesen werden, lediglich denaturierte Ringformen.

4.10 VERGLEICH ZWISCHEN GEFRIERVERFAHREN

Beim Auftauen nach Methode B (siehe 3.4.2) wurden Hämolysaten zwischen 70 % und 90 % beobachtet, während nach Methode A (siehe 3.4.1) lediglich 50 % bis 70 % der eingefrorenen Erythrozyten hämolysierten.

Vergleiche im Wachstumsverhalten nach dem Auftauen wurden nicht durchgeführt.

4.11 IN-VITRO-RESISTENZTEST

Es wurden in-vitro-Resistenztests bei den Stämmen FCB 1, FCMc 11 und FMCMc 1 durchgeführt. In Tabelle 8 wird die Anzahl der Schizonten pro 10.000 Erythrozyten bei unterschiedlichen Cloroquindisulfatdosierungen dargestellt.

TABELLE 8

Stamm	Schizonten pro 10.000 Erythrozyten ng Chloroquindisulfat pro Loch nmol pro ml Blut							
	0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00	8,00
	0,00	0,10	0,20	0,40	0,80	1,20	1,60	3,20
FCMc 11	14	13	8	0	0	0	0	0
FMCMc 1	48	20	17	9	0	0	0	0
FCB 1	67	31	11	2	0	0	0	0

Da eine komplette Hemmung der Schizontenreife bei 1,0 nmol/ml Blut volle Empfindlichkeit für Chloroquin bedeutet, können alle drei untersuchten Stämme als voll empfindlich bezeichnet werden.

4.12 INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZANTIKÖRPERTEST (IFAT)

4.12.1 Vergleich in der Titerhöhe zwischen Kulturantigen von *Plasmodium falciparum* und Antigen von tierpathogenen Plasmodienarten

In Tabelle 9 sind die Antikörpertiter aufgelistet, die bei der Untersuchung von 38 Seren von Patienten der Abteilung mit parasitologisch nachgewiesenen Malariainfektionen mit verschiedenem Antigenmaterial gemessen wurde. Die Bestimmungen mit Antigen von *Plasmodium fieldii* und *Plasmodium gallinaceum* erfolgten zum Zeitpunkt der Blutabnahme, während die Bestimmungen mit *Plasmodium-falciparum*-Kulturantigen mit denselben Seren durchgeführt wurde, nachdem sie 6 - 48 Monate bei -20 °C tiefgefroren gelagert und zum Teil mehrfach aufgetaut worden waren. Das Antigen vom Kulturstamm FMCMc 1 hatte einen Schizontenanteil von ca. 60 %, während sich im Antigen von FCB 1 nur ca. 30 % Schizonten befanden.

Da bei den Seren, die längere Zeit gelagert worden waren, niedrige Titer mit dem Kulturantigen auffallend häufig waren, wurden die Titerhöhen in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung der Seren verglichen (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5

TABELLE 9

Pat.- Nr.	Jahr	Plasmo- dienart	Pl.gall. Antigen	Pl. fieldii Antigen	FCB 1 Antigen	FMCMc 1 Antigen
2486	1979	Pl.falc.	1 : 32	1 : 16	1 : 16	1 : 16
2993	1979	"	1 : 32	1 : 64	1 : 32	1 : 32
929	1980	"	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 256
1172	1980	"	1 : 16	Ø	1 : 256	1 : 512
1471	1980	"	1 : 64	1 : 16	1 : 128	1 : 512
4247	1980	"	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 32
6367	1980	"	1 : 16	Ø	Ø	Ø
6405	1980	"	Ø	Ø	Ø	Ø
3331	1981	"	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 128
5874	1981	"	1 : 128	1 : 64	1 : 512	1 : 512
6191	1981	"	1 : 64	1 : 32	1 : 64	1 : 128
6506	1981	"	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 256
6587	1981	"	1 : 64	1 : 32	1 : 32	1 : 64
6819	1981	"	1 : 64	1 : 32	1 : 256	1 : 256
6835	1981	"	1 : 256	1 : 128	1 : 256	1 : 512
2242	1979	Pl.vivax	1 : 128	1 : 256	1 : 32	1 : 64
2524	1979	"	1 : 32	Ø	1 : 64	1 : 64
3079	1979	"	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 64
3275	1979	"	1 : 32	1 : 128	1 : 64	1 : 256
4391	1979	"	1 : 128	1 : 256	1 : 32	1 : 32
160	1980	"	1 : 256	1 : 256	1 : 64	1 : 64
402	1980	"	1 : 128	1 : 256	1 : 64	1 : 128
466	1980	"	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 256
745	1980	"	1 : 16	1 : 32	1 : 32	1 : 16
3595	1980	"	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 128
3810	1979	Pl.mal.	1 : 256	1 : 256	1 : 64	1 : 64
3447	1980	"	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 128
603	1981	"	1 : 128	1 : 64	1 : 16	1 : 32
1224	1981	"	1 : 64	1 : 32	1 : 64	1 : 128
1575	1981	"	1 : 64	1 : 32	Ø	Ø
1395	1979	Pl.ovale	1 : 32	1 : 64	Ø	1 : 32
1592	1979	"	1 : 256	1 : 256	1 : 32	1 : 128
6067	1982	"	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 128

TABELLE 9 (Fortsetzung)

Pat.- Nr.	Jahr	Plasmo- dienart	Pl.gall. Antigen	Pl. fieldii Antigen	FCB 1 Antigen	FMCMc 1 Antigen
4449	1982	Pl.falc. +Pl.mal.	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 256
4567	1982	"	1 : 64	1 : 64	1 : 128	1 : 256
5639	1982	"	1 : 64	1 : 32	1 : 256	1 : 256
1268	1980	Pl.falc. +Pl.vivax	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 128
2552	1980	"	1 : 128	1 : 256	1 : 64	1 : 16

Es zeigt sich, daß bei der Untersuchung der länger als zwei Jahre gelagerten Seren mit den Kulturantigenen niedrigere Titer gemessen wurden, während bei den kürzer gelagerten Seren die Titer mit dem Kulturantigen höher liegen als die zum Zeitpunkt der Blutabnahme bestimmten Titer mit Antigen von tierpathogenen Plasmodienarten. Weiterhin findet sich eine größere Anzahl höherer Titer mit dem Stamm FMCMc 1 als mit dem Stamm FCB 1.

4.12.2 Vergleich zwischen Schizontenantigen und gemischtem Antigen

In Tabelle 10 sind die Antikörpertiter aufgelistet, die bei Verwendung von Schizontenantigen und gemischtem Antigen von den beiden Kulturstämmen FCB 1 und FMCMc 1 bestimmt wurden. Als Negativkontrollen dienten 20 Seren von der Münchner Blutbank von Personen, die sich noch nie in Malariaendemiegebieten aufgehalten hatten. Dabei ergab sich in zwei Fällen ein positives Resultat auf der niedrigsten Verdünnungsstufe von 1 : 16 beim FCB-1-Antigen.

Bei beiden Kulturantigenen ergaben sich mit Schizontenantigen gehäuft höhere Titer (siehe Abbildung 6).

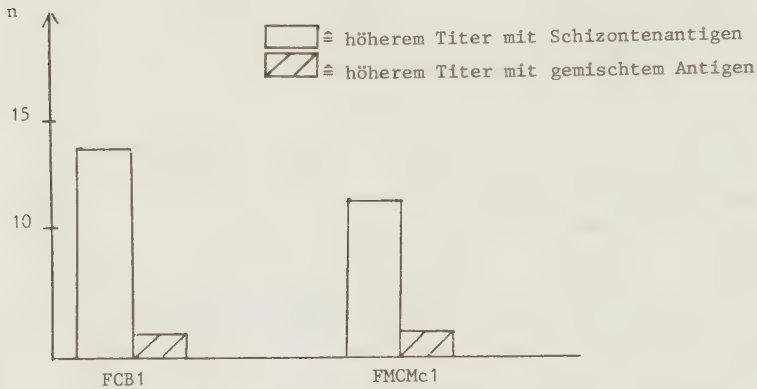


Abbildung 6

TABELLE 10

Patienten-Nr.	Plasmodienart	FCB 1 Schizonten Antigen	FCB 1 gemischtes Antigen	FMCMc 1 Schizonten Antigen	FMCMc 1 gemischtes Antigen
Kontr. 1	negativ	Ø	Ø	Ø	Ø
" 2	"	1 : 16	Ø	Ø	Ø
" 3	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 4	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 5	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 6	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 7	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 8	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 9	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 10	"	Ø	Ø	Ø	Ø

TABELLE 10 (Fortsetzung)

Patienten- Nr.	Plasmo- dienart	FCB 1 Schizonten Antigen	FCB 1 gemisch- tes Antigen	FMCMc 1 Schizonten Antigen	FMCMc 1 gemisch- tes Antigen
" 11	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 12	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 13	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 14	"	Ø	1 : 16	Ø	Ø
" 15	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 16	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 17	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 18	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 19	"	Ø	Ø	Ø	Ø
" 20	"	Ø	Ø	Ø	Ø
26/82	Pl.vivax	1 : 64	1 : 64	1 : 32	1 : 64
2306/82	"	1 : 32	1 : 16	1 : 32	1 : 16
2801/82	"	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 64
4013/82	"	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 256
4449/82	Pl.falc. +Pl.mal.	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 64
1172/80	Pl.falc.	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 128
83/82	"	1 : 512	1 : 256	1 : 128	1 : 128
677/82	"	1 : 256	1 : 128	1 : 256	1 : 256
1742/82	"	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 256
791/82	"	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 64
2800/82	"	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 64
3503/82	"	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 256
3582/82	"	1 : 128	1 : 128	1 : 256	1 : 128
6990/82	"	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 512

5.1 AUSSAGEKRAFT UND ZUVERLÄSSIGKEIT DER ERGEBNISSE

Die im Abschnitt Material und Methodik beschriebenen Kulturbedingungen, die die Anzucht des Stammes FMCMc 1 und die Vermehrung des adaptierten Stammes FCB 1 ermöglichten, stellen das Ergebnis einer Reihe von Variationen der verschiedenen Parameter dar. Diese Modifikationen sind aus eigenen Erfahrungen, die bei den erfolglosen Anzuchtversuchen gewonnen wurden, sowie aus den im Verlauf der Arbeit erschienenen Veröffentlichungen hervorgegangen.

Chin und Collins (6) geben an, daß zur Adaptation neuer Isolate an die in-vitro-Kultur im allgemeinen ein bis zwei Monate notwendig sind, und daß die Parasitämie während dieser Zeit meist sehr gering ist, so daß die Parasiten manchmal sogar im "dicken Tropfen" nur schwer nachzuweisen sind. Tabelle 3 zeigt, daß in der vorliegenden Arbeit die Anzuchtversuche teilweise zu früh aufgegeben wurden. Zur Beurteilung der Parasitämie wurden stets nur Ausstriche und keine "dicken Tropfen" verwendet.

Frühzeitige Kontaminationen verhinderten bei einigen Isolaten das Überstehen der Adaptationszeit. Die Kontaminationsrate konnte vor allem durch das Arbeiten in einer Laminarluftstrom-Sterilbank und durch die Einführung der routinemäßigen Zugabe von Gentamycin zum Nährmedium gesenkt werden.

Eine Verbesserung des Nährmediums wurde erreicht durch die Erhöhung der L-Glutamin-Konzentration (Heidrich, persönliche Mitteilung) und die Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 anstatt 7,4, da der pH-Wert des Mediums durch das Abdampfen saurer Valenzen während der Zeit der Lagerung ansteigt.

Da kein CO₂-Blutschrank zur Verfügung stand, wurde zur sicheren Aufrechterhaltung der erforderlichen Atmosphäre nach dem Abbrennen der Kerzen im Exsikkator eine sterile, kontrollierte Begasung der Kulturen durchgeführt. Es wurden jedoch keine Messungen der Partialdrucke im Exsikkator vorgenommen.

Nach Angaben von Divo und Jensen (8) wurde das Serum, das Bestandteil des Nährmediums werden sollte, möglichst innerhalb von 24 Stunden nach Abnahme eingefroren. Doch auch frisch eingefrorene Humanserum haben eine signifikante individuelle Schwankungsbreite in ihrer Fähigkeit, das Parasitenwachstum zu fördern (14). Als Konsequenz daraus sollte gepooltes Humanserum verwendet werden, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Eine mögliche Behinderung des Parasitenwachstums durch das Vorhandensein von Malariaantikörpern oder Spuren von Antimalariamitteln (37) wurde zwar nicht durch Testung ausgeschlossen, kann jedoch bei den von der Münchner Blutbank erhaltenen Blut- und Serumchargen als unwahrscheinlich gelten.

Versuche mit der halbautomatischen Kulturmethode zeigten in der vorliegenden Arbeit deutlich schlechtere Ergebnisse als die Petrischalenkulturen (siehe 4.9) und wurden daher wieder aufgegeben. Die vom Platzangebot im Labor bedingten langen Wege vom Mediumvorrat über die Rollpumpe zu den Kulturen führten zu Unregelmäßigkeiten beim kontinuierlichen Mediumdurchfluß und gingen mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko einher.

An drei Stämmen wurde ein einmaliger in-vitro-Resistenztest durchgeführt. Alle drei Stämme zeigten volle Empfindlichkeit gegenüber Chloroquin (siehe 4.11). Es wurde keine Wiederholung der Tests zum Ausschluß einer Resistenzentwicklung während der in-vitro-Kultur durchgeführt. Die von Ponnudurai et al. (23) postulierte Bezie-

hung zwischen Parasitenzahl und Chloroquinempfindlichkeit wurde nicht berücksichtigt.

Die Endtiter beim Ablesen des indirekten Immunfluoreszenzantikörpertests (IFAT) sind von der subjektiven Einschätzung des Ablesers abhängig. Sie waren jedoch bei den zwei Untersuchern weitgehend identisch bzw. wichen um nicht mehr als eine Titerstufe voneinander ab. Beim Vergleich zwischen Kulturantigen und Antigen von *Plasmodium fieldii* und *Plasmodium gallinaceum* (siehe 4.12.1) ist zu berücksichtigen, daß die Titerbestimmungen mit den letztgenannten Antigenen jeweils mit frischem Serum durchgeführt wurden, während das Kulturantigen an den 6 - 48 Monate bei -20 °C eingefrorenen und zum Teil aufgetauten und wieder eingefrorenen Seren untersucht wurde. Durch die längere Lagerung der Seren und/oder das zwischenzeitliche Auftauen und Wiedereinfrieren scheint die Antikörperaktivität abgenommen zu haben. Bei länger gelagerten Seren fielen die mit Kulturantigen bestimmten Titer niedriger aus als diejenigen, die mit den Vergleichsantigenen bestimmt wurden, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den neueren Seren (siehe Abbildung 5). Die Beobachtung, daß mit dem Antigen vom Stamm FMCMc 1 höhere Titer gemessen wurden als mit dem Antigen von FCB 1, ist eher mit dem höheren Schizontenanteil von FMCMc 1 zu erklären als mit einer grundsätzlich höheren Antigenität.

5.2 VERGLEICH MIT ANDEREN UNTERSUCHUNGEN

Andere Untersucher, die mit der Petrischalenkulturmethode arbeiteten, teilen die Erfahrung, daß die Adaptation neuer Stämme an die in-vitro-Kultur nur bei einem Teil der Isolate gelingt. Chin und Collins (6) berichten, daß sich nur zwei von 15 Stämmen sofort gut kultivieren ließen, und daß die anderen zur Adaptation ein bis zwei Monate benötigen. Aus der Arbeit von Butcher (3) geht hervor,

daß sich nur eines von mindestens 13 Isolaten in Kultur halten ließ. In der vorliegenden Arbeit konnte nach erfolglosen Versuchen mit elf Monoinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und einer Doppelinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* der Stamm FMCMc 1, eine Doppelinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae*, an die in-vitro-Kultur adaptiert werden. Da sich nach dem fünften Tag in Kultur keine eindeutigen Bandformen (beweisend für das Vorhandensein von *Plasmodium malariae*) mehr nachweisen ließen, muß davon ausgegangen werden, daß es sich im weiteren Verlauf um eine Monokultur von *Plasmodium falciparum* handelte. Über die simultane Vermehrung von *Plasmodium malariae* und *Plasmodium falciparum* in einer in-vitro-Kultur wird in der Literatur nur einmal berichtet (24). Die dort angegebene differenzierende Auszählung zwischen *Plasmodium malariae* und *Plasmodium falciparum* in allen erythrozytären Entwicklungsstadien erscheint unter lichtmikroskopischen Bedingungen nur schwer nachvollziehbar. Über den weiteren Verlauf dieser Kultur oder über weitere erfolgreiche Kultivierungen von *Plasmodium malariae* liegen keine Mitteilungen vor.

Die bei den adaptierten Stämmen FCB 1 und FMCMc 1 erzielten Wachstumsraten (siehe Tabelle 7) entsprechen den Beobachtungen anderer Untersucher (6, 17, 28, 36, 37), ebenso die mit häufigerem Mediumwechsel erzielten Steigerungen der Parasitämie (15).

Wie aus den Abbildungen 2 und 3 hervorgeht, hatte der Zusatz von 75 mg Gentamycin pro Liter Nährmedium keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstumsverhalten der untersuchten Kulturen. Ebenfalls ohne nachteiligen Effekt auf die Parasitämie wurden pro Liter Medium 200.000 IE Penicillin (28), 50 mg Gentamycin (25) und 133 mg Gentamycin bzw. 100 mg Penicillin (36) verwendet.

Die von Trigg (38) zusammengefaßten Gefrierverfahren zeigen beim Auftauen eine Hämolyserate zwischen 50 und 80 %, was den Ergebnissen mit den in 3.4 beschriebenen Methoden etwa entspricht (siehe 4.10).

Antigen aus in-vitro-Kulturen von *Plasmodium falciparum* wurde bereits mehrfach auf seine Verwendbarkeit im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) untersucht. Gupta et al. (9) sowie Thomas und Ponnampalam (31) verglichen Kulturantigen mit Antigen von infizierten Aotusaffen und kamen zu dem Ergebnis, daß die beiden Antigene im Hinblick auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit vergleichbar seien. Hall et al. (10) verwendeten zwei Stämme, die sich bereits längere Zeit in Kultur befunden hatten, und fanden hohe und reproduzierbare Antikörpertiter. Seren von nicht infizierten Personen hatten keine oder sehr niedrige Titer. Ebenso wie in der vorliegenden Untersuchung (siehe 4.12.1) wurden Unterschiede in den Titern bei der Verwendung der verschiedenen Stämme gefunden, was auf Unterschiede in der antigenen Spezifität schließen läßt.

Targett (30) hatte mit Antigen von Aotusaffen beobachtet, daß mit Schizontenantigen zwei- bis achtfach höhere Antikörpertiter nachweisbar sind als mit Antigen von Ringformen. Auch das Schizontenantigen aus den beiden in dieser Arbeit untersuchten Kulturstämmen (FCB 1 und FMCMc 1) erbrachte im Vergleich mit dem gemischten Kulturantigen in 15 Fällen höhere, in 11 Fällen gleiche und nur zweimal niedrigere Titer (siehe 4.12.2). Bei der Untersuchung von 22 negativen Kontrollseren wurde je einmal beim Schizontenantigen und beim gemischten Antigen auf der untersten Titerstufe (1 : 16) positiv abgelesen.

In früheren Arbeiten war nachgewiesen worden, daß mit Antigen von *Plasmodium gallinaceum* (19) und *Plasmodium fieldii* (21) niedrigere Titer erzielt wurden als mit An-

tigen von *Plasmodium falciparum*, das über infizierte Aotusaffen erhalten worden war. Die Sensitivität reichte jedoch aus, um die heterologen Antigene wegen ihrer besseren Verfügbarkeit in der Routineserologie einzusetzen. Tabelle 9 zeigt die deutlich höhere Empfindlichkeit von homologem Kulturantigen im Vergleich zum heterologen Antigen von *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium fieldii*, wenn man den offensichtlichen Verlust an Antikörperaktivität bei den älteren Seren berücksichtigt.

5.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die in-vitro-Kultivierung von *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* war mit den angewandten Kulturmethoden nicht möglich. Zur Anzucht dieser Plasmodienarten müssen eigene Verfahren entwickelt werden.
2. Bei der Anzucht der Doppelinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* war *Plasmodium malariae* nach kurzer Zeit nicht mehr in der Kultur nachweisbar. Die Vermutung, daß sich das Wachstum der beiden Plasmodienarten in der in-vitro-Kultur gegenseitig günstig beeinflusst, konnte nicht bestätigt werden.
3. Beim Versuch der Anzucht von Isolaten von *Plasmodium falciparum* aus dem Blut von infizierten Personen muß mit Mißerfolgen und mit geringen Wachstumsraten in der Adaptationsphase gerechnet werden.
4. Durch das Arbeiten im sterilen Laminar-Luftstrom und durch Verwendung von Gentamycin im Nährmedium kann die Kontaminationsrate erheblich reduziert werden.

5. In der Adaptationsphase sollten beim Verdacht auf Verschwinden der Parasiten aus der Kultur "dicke Tropfen" angefertigt werden und der Versuch sollte erst nach mehrmaligen negativen Kontrollen eingestellt werden.
6. Zur Erzielung höherer Parasitämien sollte das Nährmedium statt im 24stündigen im 12stündigen Intervall erneuert werden, gegebenenfalls noch häufiger.
7. Die halbautomatische Kulturmethode mit kontinuierlichem Mediumdurchfluß sollte nur bei entsprechenden apparativen Voraussetzungen angewandt werden.
8. Bei der Arbeit mit in-vitro-Kulturen sollte in regelmäßigen Abständen eine Resistenztesting durchgeführt werden, um eine mögliche Veränderung in der Empfindlichkeit der Stämme gegenüber verschiedenen Antimalariamitteln zu erfassen.
9. Im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) ergeben sich bei der Verwendung von Plasmodium-falciparum-Antigenen aus der in-vitro-Kultur höhere Titer als mit Plasmodium-fieldii- und Plasmodium-gallinaceum-Antigenen. Weiterhin ist Schizontenantigen einem gemischten Antigen vorzuziehen. Die Antikörperaktivität eingefrorener Seren nimmt während längerer Lagerung sowie bei wiederholtem Auftauen und Wiedereinfrieren ab.

Bei 15 Patienten mit parasitologisch nachgewiesener akuter Malariainfektion mit verschiedenen Plasmodienarten wurde der Versuch der Isolation der Erreger unternommen. Es wurde mit der Petrischalenkulturmethode gearbeitet, bei der die Parasiten in menschlichen Erythrozyten bei 37 - 38 °C unter verminderter Sauerstoffspannung und Zugabe von Nährmedium inkubiert werden. Die Verwendung einer halbautomatischen Kulturanordnung erwies sich als nicht geeignet. Es wurden Variationen zu den in-vitro-Kulturbedingungen erprobt. Verbesserte Wachstumsraten wurden durch die Zugabe frischen Mediums in 12stündigen statt in 24stündigen Intervallen erzielt. Die Kontaminationsrate konnte durch die Zugabe von 75 ml Gentamycin pro Liter Nährmittel gesenkt werden, ohne daß das Parasitenwachstum behindert wurde. Die Isolation von *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale* gelang nicht. Der Stamm FMCMc 1 - ursprünglich eine Doppelinfektion mit *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae*, nach dem fünften Tag in Kultur eine Monokultur von *Plasmodium falciparum* - konnte in die kontinuierliche in-vitro-Kultur gebracht werden. Es fand eine Vermehrung der Parasiten statt, die sich auch nach Einfrieren im flüssigen Stickstoff und Wiederauftauen fortsetzte. Mit diesem frischen Isolat - FMCMc 1 - und dem adaptierten Laborstamm FCB 1 wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Bei der Verwendung von Glycerin/Sorbit als Gefrierschutzmittel wurden geringere Hämolyseraten beim Auftauen beobachtet als bei Glycerin/PBS als Gefrierschutzmittel. Im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) ergaben sich mit dem Kulturantigen von FMCMc 1 und FCB 1 höhere Titer als mit dem Antigen der tierpathogenen Plasmodienarten *Plasmodium gallinaceum* und *Plasmodium fieldii*. Kulturantigen mit 90prozentigem Anteil an Schizonten lieferte im IFAT höhere Titer als gemischtes Antigen mit etwa gleichem Anteil an Ringformen, Trophozoiten und Schizonten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Bass, C.C. und Johns, F.M.: The cultivation of malarial plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) in vitro. J Exp Med 16, 567 - 579 (1912)
- 2 Bertagna, P., Cohen, S., Geiman, Q.M., Haworth, J., Konigk, E., Richards, W.H.G. und Trigg, P.I.: Cultivation techniques for the erythrocytic stages of malarial parasites. Bull WHO 47, 357 - 373 (1972)
- 3 Butcher, G.A.: Factors affecting the in vitro culture of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. Bull WHO 57 (Suppl 1), 17 - 26 (1979)
- 4 Butcher, G.A.: The behaviour of different strains of *Plasmodium falciparum* in suspension and static culture. Trans R Soc Trop Med Hyg 76, 407 - 409 (1982)
- 5 Carter, R. und Beach, R.F.: Gametogenesis in culture by gametocytes of *Plasmodium falciparum*. Nature 270, 140 - 141 (1977)
- 6 Chin, W. und Collins, W.E.: Comparative studies of three strains of *Plasmodium falciparum* isolated by the culture method of Trager and Jensen. Am J Trop Med Hyg 29, 1143 - 1146 (1980)
- 7 Christofinis, G.J. und Miller, H.: A simplified method for cryopreservation of *Plasmodium falciparum* from continuous in vitro cultures. Ann Trop Med Parasitol 77, 123 - 126 (1983)
- 8 Divo, A.A. und Jensen, J.B.: Studies on serum requirements for the cultivation of *Plasmodium falciparum*. Bull WHO 60 (4), 565 - 575 (1982)

- 9 Gupta, M.M., Sebastian, M.J., Prema Bhat und Lobel, H.O.: Evaluation of in vitro cultured Plasmodium falciparum as antigen for malaria serology. J Trop Med Hyg 84, 165 - 170 (1981)
- 10 Hall, C.L., Haynes, J.D., Chulay, J.D. und Diggs, C.L.: Cultured Plasmodium falciparum used as antigen in a malaria indirect fluorescent antibody test. Am J Trop Med Hyg 27 (5), 849 - 852 (1978)
- 11 Haynes, J.D., Diggs, C.L., Hines, F.A. und Desjardins, R.E.: Culture of human malaria parasites Plasmodium falciparum. Nature 263, 767 - 769 (1976)
- 12 Ifediba, T. und Vanderberg, J.P.: Peptones and calf serum as a replacement for human serum in the cultivation of Plasmodium falciparum. J Parasitol 66, 236 - 239 (1980)
- 13 Jensen, J.B.: Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of Plasmodium falciparum. Am J Trop Med Hyg 27 (6), 1274 - 1276 (1978)
- 14 Jensen, J.B.: Some aspects of serum requirements for continuous cultivation of Plasmodium falciparum. Bull WHO 57 (Suppl 1), 27 - 31 (1979)
- 15 Jensen, J.B. und Trager, W.: Some recent advances in the cultivation of Plasmodium falciparum. Proc Inter Symp Immunology, Immunopathology of Malaria, 61 - 68 (1977)
- 16 Jensen, J.B. und Trager, W.: Plasmodium falciparum in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J Parasitol 63, 883 - 886 (1977)

- 17 Jensen, J.B. und Trager, W.: *Plasmodium falciparum* in culture: Establishment of additional strains. *Am J Trop Med Hyg* 27, 743 - 746 (1978)
- 18 Jensen, J.B., Trager, W. und Beaudoin, R.L.: Techniques for in vitro cultivation of erythrocytic and exoerythrocytic stages of malarial parasites. Aus: *Practical Tissue Culture Applications* (Hrsg. Maramorosch, K. und Hirumi, H.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 255 - 265 (1979)
- 19 Kielmann, A., Weiss, N. und Savasin, G.: *Plasmodium gallinaceum* as antigen in human malaria. *Bull WHO* 43, 617 - 622 (1970)
- 20 López Antunano, F.J. und Wernsdorfer, W.H.: In vitro response of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* to mefloquine. *Bull WHO* 57 (4), 663 - 665 (1979)
- 21 Meuwissen, J.H.E.: Antibody response in patients with natural malaria to human and simian plasmodium antigens measured by fluorescent antibody test. *Trop Geogr Med* 20, 137 - 140 (1968)
- 22 Meuwissen, J.H.E., Leeuwenberg, A.D.E.M., Voller, A. und Matola, Y.: Specificity of the indirect haemagglutination test with *Plasmodium falciparum* test cells. Comparison of indirect haemagglutination and fluorescent antibody tests on African sera. *Bull WHO* 50, 513 - 519 (1974)
- 23 Ponnudurai, T., Leeuwenberg, A.D.E.M. und Meuwissen, J.H.E.: Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to in vitro culture. *Trop Geogr Med* 33, 50 - 54 (1981)

- 24 Rai Chowdhuri, A.N., Chouwhury, D.S. und Regis, M.L.: Simultaneous propagation of Plasmodium malariae und Plasmodium falciparum in continuous culture. Indian J Med Res 70, 72 - 78 (1979)
- 25 Richards, W.H.G. und Maples, B.K.: Studies on Plasmodium falciparum in continuous cultivation. Ann Trop Med Parasitol 73 No 2, 99 - 108 (1979)
- 26 Rieckmann, K.H., Campbell, G.H., Sax, L.J. und Mrema, J.E.: Drug sensitivity of Plasmodium falciparum. An in vitro microtechnique. The Lancet 1, 22 - 23 (1978)
- 27 Sax, L.J. und Rieckmann, K.H.: Use of rabbit serum in the cultivation of Plasmodium falciparum. J Parasitol 66, 621 - 624 (1980)
- 28 Siddiqui, W.A.: Continuous in vitro cultivation of Plasmodium falciparum in human erythrocytes: Description of a simple technique to obtain high yields of parasites. Aus: Practical Tissue Culture Applications (Hrg. Maramorosch, K. und Hirumi, H.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 267 - 277 (1979)
- 29 Sulzer, A.J., Wilson, M. und Hall, C.: Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. Am J Trop Med Hyg 18, 199 - 205 (1969)
- 30 Targett, G.A.T.: Antibody response to Plasmodium falciparum malaria. Comparisons of immunoglobulin concentrations, antibody titers and the antigenicity of different asexual forms of the parasite. Clin Exp Immunol 7, 501 - 517 (1970)

- 31 Thomas, V. und Ponnampalam, J.T.: Thick-smear Plasmodium falciparum antigen from in vitro cultures for the indirect fluorescent antibody test. Bull WHO 52, 33 - 37 (1975)
- 32 Tobie, J.E. und Coatney, G.R.: Fluorescent antibody staining of human malaria parasites. Exp Parasitol 11, 128 - 132 (1961)
- 33 Trager, W.: Malaria parasites (Plasmodium lophurae) developing extracellularly in vitro: Incorporation of labelled precursors. J Protozool 18, 392 - 399 (1971)
- 34 Trager, W.: Plasmodium falciparum in culture: An improved continuous flow method. J Protozool 26, 125 - 129 (1979)
- 35 Trager, W. und Jensen, J.B.: Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673 - 675 (1976)
- 36 Trager, W. und Jensen, J.B.: Cultivation of erythrocytic stages. Bull WHO 55 (2-3), 363 - 365 (1977)
- 37 Trager, W. und Jensen, J.B.: Cultivation of erythrocytic and exoerythrocytic stages of plasmodia. Aus: Malaria, Vol. 2 (Hrsg. Kreier, J.P.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 271 - 319 (1980)
- 38 Trigg, P.I.: Plasmodiidae. Aus: Methods of cultivating parasites in vitro (Hrsg. Taylor, A.E.R. und Baker, J.R.), Academic Press, London, New York, San Francisco, 89 - 110 (1978)

- 39 Voller, A., Meuwissen, J.H.E. und Verhave, J.P.:
Methods for measuring the immunological response to
plasmodia. Aus: Malaria, Vol. 3 (Hrsg. Kreier, J.P.),
Academic Press, London, New York, San Francisco, 67
- 109 (1980)

- 40 Wernsdorfer, W.H.: The relevance of research to the
global antimalaria programme. Bull WHO 55 (2-3), 133
- 135 (1977)

- 41 Zolg, J.W., McLeod, A.J., Dickson, I.H. und Scaife,
J.G.: Plasmodium falciparum: Modifications of the in
vitro culture conditions improving parasitic yields.
J Parasitol 68, 1072 - 1080 (1982)

LEBENS LAUF

Am 15.7.1955 wurde ich als Kind der Eheleute Margarita und Otto Pleier in Bad Reichenhall geboren. Meine Schulzeit schloß ich mit dem Abitur am humanistischen Maximiliansgymnasium in München 1975 ab. In den Jahren 1975 - 1982 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München und erhielt die Approbation als Arzt am 7.5.1982. Von 1979 - 1984 arbeitete ich an der vorliegenden Inauguraldisertation am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie. 1980 hospitierte ich im Rahmen eines ASA-Stipendiums in einem Projekt der Deutschen Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (gtz) in Ost-Kalimantan, Indonesien. Seit Oktober 1982 bin ich als Assistenzarzt an der Wolfart-Klinik in Gräfelfing bei München beschäftigt mit Fortbildung in Chirurgie und Anästhesie.

